

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

DIALOG(R) File 347:JAPIO  
(c) 1999 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

04426853  
PSEUDOMONAS PUTIDA KWI-9 STRAIN

PUB. NO.: 06-070753 [J P 6070753 A]  
PUBLISHED: March 15, 1994 (19940315)  
INVENTOR(s): NAKAMURA KANJI  
ENOMOTO MIKIJI  
APPLICANT(s): KURITA WATER IND LTD [000106] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)  
APPL. NO.: 04-228169 [JP 92228169]  
FILED: August 27, 1992 (19920827)  
INTL CLASS: [5] C12N-001/20; C02F-003/34; C12N-001/20; C12R-001/40  
JAPIO CLASS: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 28.1 (SANITATION -- Sanitary Equipment); 32.2 (POLLUTION CONTROL -- Waste Water Treatment)  
JAPIO KEYWORD: R007 (ULTRASONIC WAVES); R120 (ULTRAFILTRATION, UF)  
JOURNAL: Section: C, Section No. 1213, Vol. 18, No. 316, Pg. 54, June 16, 1994 (19940616)

#### ABSTRACT

PURPOSE: To provide a new microorganism useful for treatments for converting trichloroethylene into non-toxic substances because of aerobically decomposing the trichloroethylene to perfectly remove the halogen without by-producing intermediate products such as vinyl chloride.

CONSTITUTION: The trichloroethylene-decomposing Pseudomonas.putida KWI-9 (FERM P-13109) having a phenol-utilizing ability and not having a toluene-utilizing ability. The microorganism is preferably obtained by screening microorganisms by a method comprising adding phenol to separation sources such as river water or soil, isolating several strains from the thus accumulated phenol-decomposing bacteria, and subsequently examining the trichloroethylene-decomposing abilities of the bacteria, respectively, in a trichloroethylene-containing inorganic medium.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-70753

(43)公開日 平成6年(1994)3月15日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/20	A	7236-4B		
	D	7236-4B		
C 0 2 F 3/34	Z			
// (C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:40)				

審査請求 未請求 請求項の数1(全 5 頁)

(21)出願番号 特願平4-228169

(22)出願日 平成4年(1992)8月27日

(71)出願人 000001063

栗田工業株式会社

東京都新宿区西新宿3丁目4番7号

(72)発明者 中村 寛治

東京都新宿区西新宿3丁目4番7号 栗田  
工業株式会社内

(72)発明者 榎本 幹司

東京都新宿区西新宿3丁目4番7号 栗田  
工業株式会社内

(74)代理人 弁理士 柳原 成

(54)【発明の名称】 シュードモナス プチダ KWI-9菌株

(57)【要約】

【構成】フェノール資化能を有し、トルエン資化能を有さないトリクロロエチレン分解性シュードモナス プチダ KWI-9 (*Pseudomonas putida* KWI-9) 菌株。この菌株は河川水から単離されたもので、シュードモナス プチダの新規な菌株である。

【効果】 この菌株はトリクロロエチレンを好氣的に分解して完全に脱ハロゲン化し、1, 1-ジクロロエチレン、1, 2-ジクロロエチレン、ビニルクロライドなどの中間生成物を生成しないので、トリクロロエチレンの好氣的分解による無害化に有用である。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 フェノール資化能を有し、トルエン資化能を有さないトリクロロエチレン分解性シュードモナス プチダ KWI-9菌株。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は新規なシュードモナス プチダ KWI-9 (*Pseudomonas putida* KWI-9) 菌株に関し、さらに詳しくはトリクロロエチレン分解性を有する新規なシュードモナス プチダ KWI-9菌株に関する。

【0002】

【従来の技術】トリクロロエチレンは溶剤として広く使用されているが、有毒であり、自然の微生物によって容易に分解されないため、各地で土壌、地下水汚染を引起している。トリクロロエチレンの処理方法としては活性炭などに吸着させて除去する方法があるが、この方法はただトリクロロエチレンを回収するだけで、無毒化することはできず、本質的な解決にはなっていない。

【0003】また嫌氣的な処理によりトリクロロエチレンを分解することもできるが、毒性の高いジクロロエチレンやビニルクロライドなどの中間生成物が生成されるという問題点がある。このような問題点の解決に、トリクロロエチレンを分解する微生物の利用は有効な対策となり得る。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、トリクロロエチレンを分解する新規な微生物を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、フェノール資化能を有し、トルエン資化能を有さないトリクロロエチレン分解性シュードモナス プチダ KWI-9菌株である。

【0006】本発明のシュードモナス プチダ KWI-9菌株は、河川水、土壌など、自然界から分離される新規な菌株であり、通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に、微工研菌寄第13109号(FERM P-13109)の微生物受託番号で寄託されている。

【0007】本発明のシュードモナス プチダ KWI-9菌株は、河川水、土壌などの分離源からスクリーニングにより単離される。スクリーニングは、分離源にフェノールを添加してフェノール分解菌を集積し、このフェノール分解菌の中からいくつかの菌株を単離する。その各々の菌株についてトリクロロエチレンを含む無機培地でトリクロロエチレン分解能の有無を検討してトリクロロエチレン分解能を有する菌を単離することができる。

【0008】スクリーニングとしては、次のような方法で行うのが好ましい。ガラスビーズを充填したカラムに

2

河川水を植種し、リン、窒素、マグネシウムおよび微量元素(Ca、Mo、Fe、Zn、Mn、Cu、Co、B)を含む1mg-C/lのフェノールを20℃で約2か月間通水して集積する。2か月後、ガラスビーズ上に付着、生育したフェノール分解菌を超音波発生装置で処理し、滅菌水に懸濁させる。この菌溶液をペプトン、酵母エキス、寒天を含むフェノール分解菌単離培地に塗布し、30℃で48時間培養してコロニーを形成させる。このコロニーの中からいくつかの菌株を単離して、その各々について、100mg/lのフェノールと、リン、窒素、マグネシウムおよび上記微量元素を含む培地でフェノール分解(資化)試験を行い、フェノール分解能を有する菌株を単離する。さらにその中からトリクロロエチレン分解能のある菌株を選出するために、10mg/lのトリクロロエチレンと、リン、窒素、マグネシウムおよび上記微量元素を含む培地にフェノールで培養した各々の菌株を懸濁し、トリクロロエチレン分解能の有無を検討する。このようにしてトリクロロエチレン分解能を有するシュードモナス プチダ KWI-9菌株を単離する。

【0009】次に本発明のシュードモナス プチダ KWI-9菌株の菌学的性質について説明する。なお菌学的性質の試験および分類方法は、下記の文献に基づいて行った。バージェイス マニュアル オブ デターミネイティブ バクテリオロジー第8版(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th Edition)およびバージェイス マニュアル オブ システマティック バクテリオロジー(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)

【0010】(a) 形態

1. 細胞の形、大きさ：短桿菌。長さ2.0~3.0μm、幅0.7~1.0μm。
2. 細胞の多形性の有無：特になし。
3. 運動性：あり。  
鞭毛(種類、数)：1本の極鞭毛を持つ。
4. 胞子の有無：なし。
5. グラム染色：陰性。
6. 抗酸性：なし。

【0011】(b) 各培地における生育状態

1. 肉汁寒天平板培養：30℃、48時間の培養で、直径約2mmのコロニーに生育する。円形、とつ円状、表面は滑らかで光沢がある。黄色を帯びた白色。
2. 肉汁寒天斜面培養：30℃、24時間の培養で生育。表面は滑らかで光沢がある。黄色を帯びた白色。
3. 肉汁液体培養：30℃、24時間の培養で白濁。
4. 肉汁ゼラチンつく穿刺培養：20℃、約3日の培養で、表面に生育する。ゼラチンは液化せず。
5. リトマスミルク：微アルカリ性。

## 【0012】(c) 生理学的性質

1. 硝酸塩の還元：陰性。
2. 脱窒反応：陰性。
3. MRテスト：陰性。
4. VPテスト：陰性。
5. インドールの生成：陰性。
6. 硫化水素の生成：陰性。
7. デンプンの加水分解：陰性。
8. クエン酸の利用：Koserの培地；陽性。Christensenの培地；陽性。
9. 無機窒素源（硝酸塩およびアンモニウム塩）の利用：硝酸塩およびアンモニウム塩を利用できる。
10. 色素の生成：色素は生成しない。
11. ウレアーゼ：陽性。
12. オキシダーゼ：陽性。
13. カタラーゼ：陽性。
14. 生育の範囲（pH、温度など）：pH；5～8。5で生育、6～7が最適。温度；15～35℃で生育、30℃前後が最適。37℃で生育が著しく遅い。41℃で生育しない。
15. 酸素に対する態度：好気性。
16. O-Fテスト：好気的に酸を生成。
17. 糖類から酸およびガスの生成の有無：

	酸	ガス
1) L-アラビノース	(+)	(-)
2) D-キシロース	(-)	(-)
3) D-グルコース	(+)	(-)
4) D-マンノース	(-)	(-)
5) D-フルクトース	(+)	(-)
6) D-ガラクトース	(-)	(-)
7) 麦芽糖（マルトース）	(-)	(-)
8) ショ糖（シュクロース）	(-)	(-)
9) 乳糖（ラクトース）	(-)	(-)
10) トレハロース	(-)	(-)
11) D-ソルビット	(-)	(-)
12) D-マンニット	(-)	(-)
13) イノシット	(-)	(-)
14) グリセリン	(+)	(-)
15) デンプン	(-)	(-)

## 【0013】(d) その他の性質

1. アルギニンの分解：陽性。
2. フェノールの利用：フェノールにより増殖する。
3. トルエンの利用：トルエンにより増殖せず。
4. 栄養要求性：なし。
5. トリクロロエチレン分解能：あり。
6. 1, 1-ジクロロエチレン分解能：あり。
7. 1, 2-ジクロロエチレン分解能：あり。
8. ビニルクロライド分解能：あり。

【0014】上記の菌学的性質から前記文献の分類方法に基づいて検索した結果、シュードモナス プチダには

ば一致した。公知のシュードモナスと比較すると、シュードモナス プチダ F1、シュードモナス セバシア G4（ともに特開昭64-34499号）およびシュードモナス メンドシナ KR1（特表平2-503866号）がトリクロロエチレンを分解するシュードモナスとして知られているが、これらはいずれもトルエン資化能を有しているのに対し、本発明の菌株はトルエン資化能を有しておらず、この点で公知のシュードモナスとは異なっている。

10 【0015】以上の通り、本発明の菌株は公知の菌株とは区別されるため、シュードモナスプチダに属する新菌株と判断され、シュードモナス プチダ KWI-9と命名し、前記の通り、平成4年8月7日に通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に寄託された。

20 【0016】本発明のシュードモナス プチダ KWI-9菌株を培養するために用いられる培地の栄養源としては、炭素源、窒素源、無機塩等、微生物の生育に必要であって、この菌株が資化可能な栄養源であればいかなるものでも使用でき、通常の好気的な培養方法により培養することができる。

【0017】好ましい培養方法としては、炭素源および窒素源としてペプトン、トリプトン、酵母エキス等、無機塩として塩化ナトリウム、塩化カリウム等を用い、培地のpH5～8、5、好ましくは6～7、温度15～35℃、好ましくは30℃前後で好気的に培養するのが望ましい。

30 【0018】本発明のシュードモナス プチダ KWI-9菌株はトリクロロエチレンを好気的に分解して完全に脱ハロゲン化し、1, 1-ジクロロエチレン、1, 2-ジクロロエチレン、ビニルクロライドなどの中間生成物を生成しない。また、1, 1-ジクロロエチレン、1, 2-ジクロロエチレン、ビニルクロライドも好気的に分解し、完全に脱ハロゲン化する。従って、これらの塩素化エチレンを微生物により完全に脱ハロゲン化し、無害化処理する用途に有用である。

## 【0019】

【実施例】次に本発明の実施例について説明する。

参考例1（シュードモナス プチダ KWI-9の単離）

40 ガラスビーズを充填したカラムに神奈川県相模川の河川水を植種し、リン、窒素、マグネシウムおよび微量金属（Ca、Mo、Fe、Zn、Mn、Cu、Co、B）を含む1mg-C/lのフェノールを20℃で約2か月間通水した。2か月後、ガラスビーズ上に付着、生育したフェノール分解菌を超音波発生装置で処理し、滅菌水に懸濁させた。この菌溶液を下記フェノール分解菌単離培地に塗布し、30℃で48時間培養してコロニーを形成させた。このコロニーの中からいくつかの菌株を単離して、その各々について、100mg/lのフェノールと、リン、窒素、マグネシウムおよび上記微量金属を含

5

む培地でフェノール分解試験を行い、フェノール分解能を有する数種類の菌株を単離した。さらにすべての単離菌を、各々フェノール100mg/lを含み、リン、窒素、マグネシウムおよび上記微量金属を含む培地で増殖させ、集菌した後、トリクロロエチレン10mg/lを含み、リン、窒素、マグネシウムおよび上記微量金属を含む培地中に懸濁してトリクロロエチレン分解能の有無を検討し、トリクロロエチレン分解能を有するシュードモナス プチダ KWI-9菌株を単離した。

【0020】フェノール分解菌単離培地:

BBLトリプチケースペプトン	1 g
ディフコ (Difco) 酵母エキス	0.3 g
極東精製寒天	13 g
蒸留水	1000 ml
pH	7.1

【0021】実施例1

参考例1で単離したシュードモナス プチダ KWI-9菌株を下記SOB培地で30℃で培養し、600nmでの吸光度(以下、 $A_{600}$ という)が1.5に達した時点で遠心分離により集菌し、下記無機培地に $A_{600}$ が2.0になるように懸濁した。これにフェノール200mg/lを添加し、30℃で一晩培養した。翌朝、再び200mg/lのフェノールを加え、さらに30℃で2時間培養した後集菌し、下記無機培地に $A_{600}$ が2.0になるように懸濁した。

【0022】この菌溶液10mlを125ml容のバイアルビンに入れ、トリクロロエチレン10mg/l(すべて液に溶解した場合の濃度)を添加し、テフロンコートブチルゴム栓をした後、アルミニウムキャップでシールした。このバイアルビン30℃、200rpmで振とう培養し、定期的に気相をサンプリングし、トリクロロエチレンの分解試験を行った。結果を図1に示す。

【0023】SOB培地:

バクト (Bacto) トリプトン	20 g
バクト (Bacto) 酵母エキス	5 g
5M NaCl	2 ml
2M KCl	1.25 ml
蒸留水	全量で990 mlとする
pH	7.0

6

上記溶液をオートクレーブで殺菌し、室温まで冷却した後、これとは別のビンでオートクレーブにより殺菌した2M  $Mg^{2+}$ 液(1M  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  + 1M  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )を10ml加える。

【0024】無機培地:

$Na_2HPO_4 + KH_2PO_4$ (1M, pH6.8)	40ml
Huntner's vitamin-free mineral base #1	20ml
$(NH_4)_2SO_4$	1g
蒸留水	840ml

10 #1 Huntner's vitamin-free mineral base;

ニトリロ三酢酸	10.0 g
$MgSO_4$	14.45 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3.335g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	9.25 mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	99 mg
メタルズ" 44" #2	50 ml

蒸留水 全量で1000mlとする

#2 メタルズ" 44" (Metals"44");

エチレンジアミン四酢酸 250.0mg

20 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1095.0mg (250mg Zn)
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	500.0mg (100mg Fe)
$MnSO_4 \cdot H_2O$	154.0mg (50mg Mn)
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	39.2mg (10mg Cu)
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	24.8mg (5mg Co)
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	17.7mg (2mg B)

数滴の硫酸を加えて沈殿を防止する

蒸留水 100ml

【0025】

【発明の効果】本発明によれば、フェノール資化能を有し、トルエン資化能を有さないトリクロロエチレン分解性の新規なシュードモナス プチダ KWI-9菌株が得られ、この菌株によりトリクロロエチレンを好氣的に分解して完全に脱ハロゲン化し、1, 1-ジクロロエチレン、1, 2-ジクロロエチレン、ビニルクロライドなどの中間生成物を生成することなく、トリクロロエチレンの好氣的分解による無害化に利用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1の結果を示すグラフである。

(5)

特開平6-70753

【図1】

